

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Biologie der Sarcoptes-Milbe

2.1.1 Taxonomie

Als zahlenmäßig größte und in Human- und Veterinärmedizin bedeutungsvollste Unterklasse der Arachnida zeigen die Acari große Gestaltenfülle. Sie haben sich verschiedenen Lebensbedingungen angepasst (an Pflanzen, Tieren und Menschen) und alle Lebensräume besiedelt. Nach Hiepe und Ribbeck (1982) werden die Sarcoptes-Milben folgender Systematik zugeordnet:

Stammgruppe Articulata	- Gliedertiere
Stamm Arthropoda	- Gliederfüßler
Abteilung Amandibulata	- Kieferlose
Unterstamm Chelicerata	- Fühlerlose
Klasse Arachnida	- Spinnentiere
Unterklasse Acari	- Zecken und Milben
Überordnung Anactinotrichida	
Ordnung Astigmata	
Überfamilie Sarcoptidae	- Räude milben
Familie Sarcoptidae	
Gattung Sarcoptes	- Grabmilben

In der Fachliteratur existieren unterschiedliche Meinungen über die Klassifizierung der Sarcoptes-Milben. Unter den Autoren ist die Auffassung darüber geteilt, ob die bei den verschiedenen Wirtsorganismen auftretenden Sarcoptes-Milben eigenständige Arten (z.B. *Sarcoptes scabiei* - Krätzmilbe des Menschen; *Sarcoptes canis* - Räude milbe des Hundes) darstellen, oder ob es sich um Varietäten einer Art (z.B. *S. scabiei* var. *hominis*; *S. scabiei* var. *canis*) handelt (Hiepe und Ribbeck, 1982). Das Problem liegt darin, dass nicht jeder Wirt seine eigene Sarcoptes-Art hat, die morphologische Ähnlichkeit sehr groß ist und Kreuzübertragungen möglich sind.

In der Fachliteratur werden 30 Arten sowie 15 Varietäten von *Sarcoptes scabiei* beschrieben neben etwa 40 Wirten, einschließlich dem Menschen, aus 17 Familien und 7 Ordnungen der Säugetiere, die für *Sarcoptes*-Milben empfänglich sind (Fain, 1990). Es ist anzunehmen, dass das breite Wirtsspektrum Ausdruck einer besonderen physiologischen Adaptationsfähigkeit ist und somit die Erklärung für die sehr ausgeprägte innerartliche morphologische Variabilität darstellt (Andrews, 1983). Die Variabilität innerhalb der einzigen anerkannten Spezies *Sarcoptes scabiei* äußert sich durch drei Kriterien: Wirtsvariabilität, individuelle Variabilität innerhalb eines Stammes sowie geographische Variabilität (Fain, 1978) und ist Ausdruck einer noch nicht vollendeten Adaptation. Die Haut der verschiedenen Wirtsorganismen bietet den Erregern in chemischer und physikalischer Hinsicht variable Lebensbedingungen, an die sich die *Sarcoptes*-Varietäten adaptiert haben. Nach Auffassung von Kobulej (1955) war jedoch im Zuge der Haustierdomestikation und dem damit einhergehenden ständigen Wirtswechsel phylogenetisch eine Fixierung bestimmter Eigenschaften und somit eine Artdifferenzierung nicht möglich.

Durch direkten Kontakt oder durch Teilung und Nutzung gleicher Habitate kam es auch zur Übertragung an freilebende und in Gefangenschaft gehaltene Wildtiere. Dementsprechend ist die morphologische und physiologische innerartliche Variabilität von *Sarcoptes scabiei* sicherlich auch als Resultat permanenter Kreuzungen sowohl von Stämmen des Menschen als auch seiner Haustiere zu betrachten. Daraus ist die epidemiologische Konsequenz abzuleiten, dass Haustiere aufgrund der langen Adaptation sowie des meist räumlich engen mittelbaren und häufig direkten Kontaktes, insbesondere von Hunden, eine Ansteckungsquelle für den Menschen darstellen können.

2.1.2 Ontogenese und Morphologie

Über die Dauer der gesamten Entwicklung unter günstigen Umweltbedingungen findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. Sie reichen von 10 (Mumcuoglu und Ruffli, 1982) bis 14 Tage (Eichler, 1980; Hiepe und Ribbeck, 1982) für die männlichen und 15 (Mumcuoglu und Ruffli, 1982; Van Neste, 1986) bis 21 Tage (Bornstein, 1995; Eichler, 1980) für die weiblichen Milben. Die Entwicklung verläuft

über drei aktive Stufen - vom Ei über Larve (sechsbeinig), Proto- sowie Teleonymphe (achtbeinig) zu den Adulten (Kutzer 1992; Arlian, 1989).

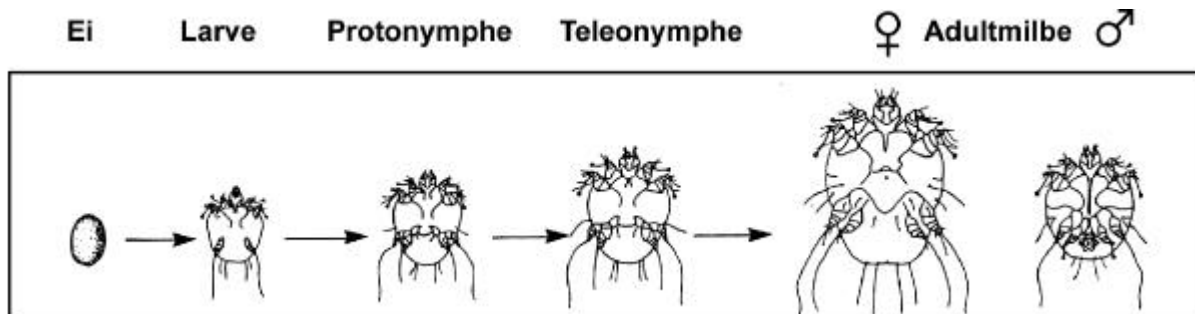


Abb. 1: Entwicklungsstadien der Sarcoptes-Milbe
(Mehlhorn, H.: Parasitology in Focus)

In der Literatur existieren im wesentlichen drei unterschiedliche Meinungen zum Entwicklungszyklus von *Sarcoptes scabiei*.

Der Entwicklungszyklus beginnt mit der Grabtätigkeit begatteter weiblicher Adultmilben, die bis zum Stratum granulosum, mitunter sogar ins Stratum spinosum ihre Tunnel graben und dort täglich 2–3 Eier ablegen. Die Larven schlüpfen in den Bohrgängen, wo sie nach Kutzer (1970) größtenteils verbleiben, bis sie sich zu Protonymphen und anschließend zu Teleonymphen häuten. Erst die Teleonymphen gelangen auf die Hautoberfläche, wobei sich die männlich determinierten Nymphen sofort zu Adultmilben häuten und noch die weiblichen Teleonymphen auf der Hautoberfläche begatten. Erst nach der Kopulation häuten sich dann auch die weiblichen Teleonymphen zu Adultmilben.

Nach Mumcuoglu und Rufli (1982) verlassen die Larven die Bohrgänge und entwickeln sich auf der Hautoberfläche nach 3–4 Tagen direkt zu männlichen Adultmilben oder nach etwa 8 Tagen über weibliche Teleonymphen zu weiblichen Adultmilben.

Nach Mellanby (1977) und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen von Van Neste (1981, 1985, 1986), verlassen die geschlüpften Larven ebenfalls den Hauttunnel, bohren sich in die Nähe von Haarfollikeln oder in Hautfalten oberflächlich ein, häuten sich zu Nymphen und entwickeln sich ohne zweites Nymphenstadium zu männlichen und weiblichen Adultmilben. Anschließend suchen und begatten die

männlichen Milben ihre weiblichen Geschlechtspartner. Die weiblichen Adultmilben halten sich zunächst in kleinen Bohrgängen auf, kehren nach der Kopulation auf die Hautoberfläche zurück und graben sich dann einen permanenten Bohrtunnel zur Eiablage.

Während die männlichen Milben nach der Kopulation sterben (Folz, 1984), leben die weiblichen Adultmilben 3–6 Wochen (Moriello, 1987; Bornstein, 1995) und legen in dieser Zeit in den benannten Bohrgängen etwa 50 Eier ab (Barriga, 1981).

Der Körper der *Sarcoptes*-Milbe hat die Form einer Schildkröte. Ventral ist er gewölbt, dorsal ist er abgeflacht und an der Oberfläche mit kräftigen Dornen, zahlreichen kutikulären Hautschuppen und schräg gefurchten kutikulären Riefen versehen (Arlan, 1989). Von den acht Beinen überragen nur die beiden stummelförmigen vorderen Beinpaare den seitlichen Körperrand. Die hinteren Beinpaare weisen distal an den Tarsen lang ausgezogene Borsten auf (Kraiß und Kraft, 1987).

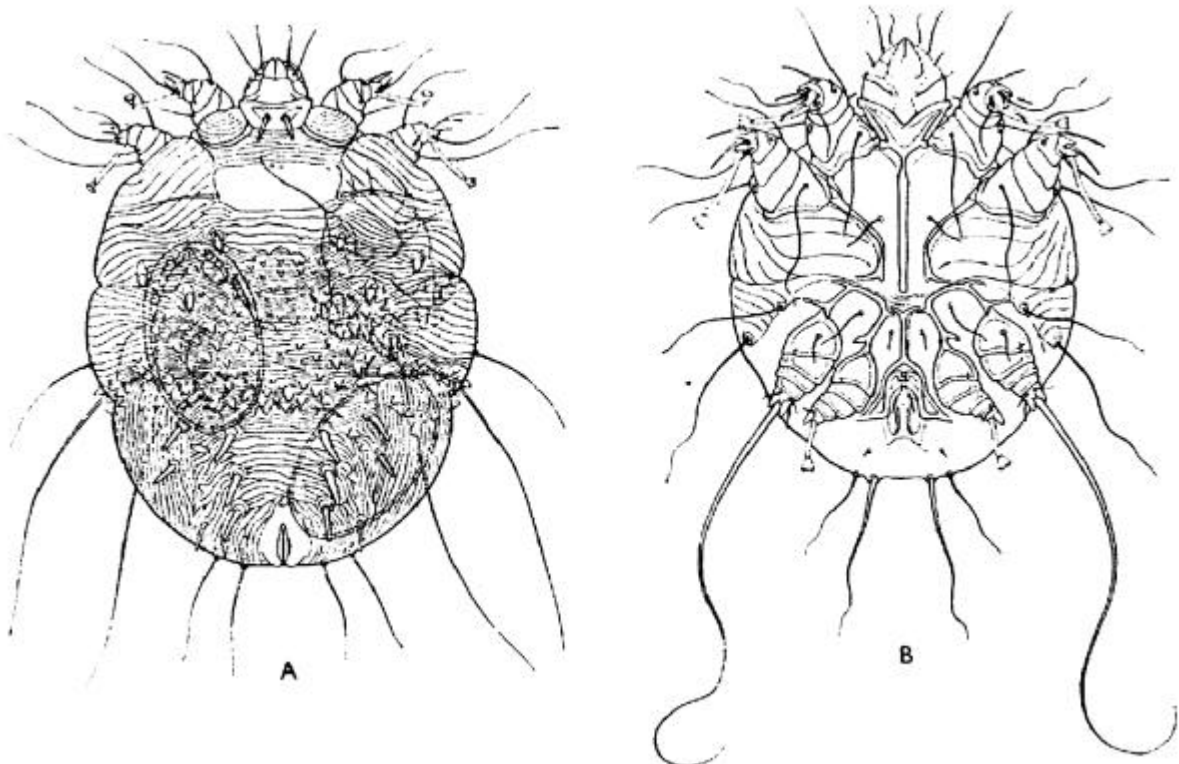


Abb. 2: *Sarcoptes scabiei*

A: Dorsalansicht der weiblichen Adultmilbe

B: Ventralansicht der männlichen Adultmilbe

(Soulsby, E.: Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals)

Die Larven sind etwa 140 – 210 x 100 – 160 µm groß, die Protonymphen 180 – 300 x 130 – 250 µm. Die weiblichen Adulten übertreffen mit 300 - 515 µm Länge und 225 - 400 µm Breite die Körpermaße der männlichen Adultmilben (205 - 285 µm Länge, 145 - 210 µm Breite).

Zur geschlechtlichen Differenzierung dienen die auf einem ungegliederten Stiel sitzenden Haftscheiben, die sich bei den weiblichen am 1. und 2. und bei den männlichen Milben zusätzlich am 4. Beinpaar befinden.

2.2 Epidemiologie

Die Epidemiologie befasst sich mit der Untersuchung der Entstehung von Krankheiten, den Ursachen, der Häufigkeit des Auftretens, ihrer Ausbreitung und der gegenseitigen Übertragung in Populationen. Nicht nur die kranken, sondern auch die klinisch inapparent infizierten sowie die gesunden Mitglieder einer Population charakterisieren den Status der Untersuchungseinheiten und werden in die epidemiologischen Untersuchungen mit einbezogen (Rolle und Mayr, 1993).

Die Sarcoptes-Räude ist weltweit verbreitet und wird hauptsächlich durch den Kontakt von Tier zu Tier nach dem horizontalen und vertikalen Infektionsprinzip übertragen. Der Milbentransfer über direkten Hautkontakt schließt nicht nur Hunde, sondern auch Beute- und Jagdtiere sowie andere Haus- und Nutztiere ein. Diejenigen Hunde, bei denen die Sarcoptes-Räude nicht erkannt wird, stellen eine bedeutende Infektionsquelle dar, da sie durch Fehlbehandlungen zu latenten Parasitenträgern werden.

Bei der indirekten Übertragung spielen die Benutzung milbenkontaminierter Lagerstätten, Bürsten, Kämmen und anderer Gegenstände eine große Rolle. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Larven, Nymphen und Adultmilben häufig die gegrabenen Gänge verlassen, auf der Haut umherlaufen (Kutzer, 1970; Mumcuoglu und Ruffli, 1982) und somit durch Herabfallen neue Tiere befallen können.

Nach Kraiß und Kraft (1987) soll sich das Angehen der in ihrer Herkunft artfremden *Sarcoptes scabiei*-Milben bei Hunden aus der potentiellen morphologischen und physiologischen Typenvielfalt des Stammes erklären, die stets eine Kombination von

Varianten repräsentiert und so auch hunde-adaptationsfähige Milben einschließt. Wenn die Reaktionslage des neuen Wirtes ein Angehen und eine ausreichende Vermehrung der Milben begünstigt, können die zunächst mengenmäßig wenigen hunde-adaptierten *Sarcoptes*-Milben eines ursprünglich artfremden Stammes im Laufe der Zeit dominieren und so eine klinisch manifeste Räude hervorrufen.

Folgende Prädispositionen begünstigen das Angehen der Räude: Vitamin A-Mangel, Eiweißmangel, Kalziumüberschuss und Phosphormangel im Futter, starker Wurmbefall und Resorptionsstörungen.

Durch das zoonotische Potential der *Sarcoptes*-Räude sind die Personen, die ständigen Kontakt mit räudeigen Haustieren haben, für eine Infektion prädisponiert. So ist zum Beispiel *Sarcoptes canis* ohne weiteres auf den Menschen übertragbar (Kobulej, 1955) und tritt nach Werth (1977) und Fain (1990) am häufigsten als Verursacher der Skabies beim Menschen auf. Stoßen die Milben auf für sie geeignete Lebensbedingungen, so lösen sie je nach Veranlagung und Befallsintensität beim Erkrankten eine sogenannte Scheinräude (Pseudoskabies) aus. Das bedeutet, dass sich die wirtsfremden *Sarcoptes*-Arten am Menschen nicht dauerhaft ansiedeln können und nach 2-3 Wochen absterben (Kutzer, 1966).

Wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Infestation durch wirtsungebundene Milben ist ein ökologisches Toleranzvermögen, das ein Überleben außerhalb des Wirtes zumindest kurzfristig bei gleichzeitig erhaltener Infestationsfähigkeit gewährleistet. Relative Luftfeuchtigkeit und Umgebungstemperatur sind dabei für die *Sarcoptes*-Milben ausschlaggebend, da sie empfindlich auf Austrocknung reagieren. Die Austrocknungsgefahr ist bei relativ niedrigen Temperaturen und höherer Luftfeuchtigkeit am geringsten (Tab. 1).

Unter günstigsten Bedingungen leben die weiblichen Milben 4–6 Wochen (Bornstein, 1995), die männlichen sterben nach Folz (1984) direkt nach der Kopulation, nach Eichler (1980) beträgt ihre Lebensdauer etwa 2 Monate.

Tab. 1: Einfluss von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit auf die Überlebensdauer der Sarcoptes-Milbe (nach Arlian et al., 1984a)

Temperatur	Luftfeuchtigkeit	Überlebensdauer
25°C	97 %	35 Stunden
25°C	25 %	13,5 Stunden
20°C	97 %	19 Tage
20°C	25 %	30 Stunden
10°C	97 %	19 Tage
10°C	25 %	3 Tage
50 °C	75 %	10 Minuten
- 25 °C	50 %	1 Stunde

Bei verschiedenen Untersuchungen zeigte sich, dass die Sarcoptes-Milben mindestens für die Hälfte bis zu zwei Drittel ihrer Überlebenszeit außerhalb des Wirtes noch infektiös bleiben. D.h., sie können sich auch dann noch in die Haut des neuen Wirtes eingraben und sich dort vermehren (Arlian, 1989).

Außerhalb des Wirtes vermögen die Milben spezifische Wirtsreize zu perzipieren und gezielt orientiert zu beantworten, wobei thermische Stimuli im unmittelbaren Kontaktbereich bis ca. 5 cm Entfernung zur Hautoberfläche die Suchaktivität bestimmen, die Milben also zunächst primär dem Wärmegradienten folgen. In weiterer Distanz vom Wirt stellen abgestrahlte Duftstoffe die wesentliche Reizqualität dar (Arlian et al. 1984c). Der Aktionsradius der Milben abseits des Wirtes überschreitet in der Regel kaum einen Meter (Kutzer, 1992). Sie können sich auf glatten Unterlagen besser als auf rauhen fortbewegen. Außerdem bevorzugen sie dunkle, nicht der unmittelbaren Sonneneinstrahlung ausgesetzte Areale. Bei Temperaturen unter 8 °C bewegen sich die Sarcoptes-Milben nicht (Kutzer, 1966). Abseits des Wirtstieres überleben die Sarcoptes-Milben meist keine 10 Tage (Kutzer, 1992).

Über die Fähigkeit die Haut zu penetrieren verfügen alle Stadien. Larven bohren sich mit nur 9 min wesentlich schneller völlig ein als Nymphen (13 min) sowie männliche und weibliche Adultmilben mit 17 bzw. 23 min (Arlian et al., 1983).

2.3 Pathogenese und Klinik der Sarcoptes-Räude

Bei der Sarcoptes-Räude ist die Gesamtheit der postembryonalen Stadien der Parasiten an den pathogenen Vorgängen beteiligt, wobei sich ein Übergang vom Ekto- zum Endoparasitismus vollzieht. Die Sarcoptes-Räude befällt den Hund unabhängig von Geschlecht, Alter, Rasse und Haarlänge. Alle Schichten der Epidermis dienen als Infestationsareal (Gothe, 1985), die Milben zeigen aber eine deutliche Vorliebe für bestimmte Körperregionen. Diese Prädilektionsstellen sind Kopf (insbesondere Nasenrücken, Ohrränder, Ohrgrund, Umgebung der Augen) und Hals, ebenso Ellenbogen, Sprunggelenk und weichhäutige Körperstellen wie Unterbauch und Innenschenkel (Hiepe, 1982). Durch die Beweglichkeit der Milben breitet sich die Infektion auf benachbarte Gebiete aus und generalisiert schließlich. Nach der Begattung der weiblichen Nymphen beginnt deren Grabtätigkeit in die Haut und damit auch die Kaskade der pathogenen Einwirkung. Mit ihren Chelizeren und unter Einfluss der Speicheldrüsensekrete bohren sich die Milben in die Haut und schaffen sich die erforderliche Bewegungsfreiheit. Dabei kommt es zur Ruptur von Interzellularbrücken, Zellolyse und Akantholyse. In den bis zu 1 cm langen Tunneln lassen die weiblichen Milben an amorphem Material haftende Eier und Kotbestandteile zurück. Bei ihrer Passage durch unvollständig differenzierte Epidermisschichten kommt es zur Parakeratose, da die luftexponierten Epidermalzellen einer gestörten Enddifferenzierung unterworfen sind (Asselineau et al., 1986). Durch die Grabgänge dringt Luft in das Gewebe ein, was dazu führt, dass die Zellen teilweise von ihrer Unterlage abgehoben werden und infolge mangelhafter Ernährung verhornen (Dahme und Weiss, 1988).

Als Nahrung dienen den Milben aufgelöste Hornzellen und Gewebsflüssigkeit, die in die Grabgänge sickert (Arlian et al., 1988c). So kommt es zur Verteilung löslicher Sekrete und Exkrete der Milben, die in den Hautschichten Entzündungs- und Immunreaktionen hervorrufen. Das abgesonderte toxische Material und die Sekretion

allergischer Substanzen führt zur Sensibilisierung des Wirtsorganismus (Anderson, 1979) und sekundär zu allergischen, bakteriellen und traumatischen Prozessen (Dahme und Weiss, 1988). Die Inkubationszeit verläuft zunächst symptomlos und variiert zwischen zwei bis acht Wochen (Niemand und Suter, 1989). Sie ist abhängig von der Zahl der übertragenen Milben, der Infestationsstelle und der Empfänglichkeit des Wirtes (Moriello, 1987). Dann tritt bei den räudekranken Hunden starker Juckreiz auf, der sich nachts und in warmer Umgebung verstärkt. Äußerlich zeigen sich Erytheme, Papeln und Schuppen, Haarverlust, kleine hämorrhagische Krusten, Falten und dicke, mit Rissen durchsetzte Borken. Der sich kontinuierlich verstärkende Pruritus führt dazu, dass sich die Hunde kratzen, scheuern und benagen. Somit kommt es zu flächenhaften Exkoriationen und Exsudationen, die mit Austrocknung der Haut und weiterer Krustenbildung einhergehen (Newcomb et al., 1987).



Abb. 3: Klinisches Bild der *Sarcoptes*-Räude beim Hund: Generalisierter Befall mit deutlich sichtbaren Prädilektionsstellen
(Wilkinson/Harvey: Farbatlas der Hautkrankheiten bei kleinen Haustieren)

Ob es nun zu einer klinisch manifesten Infektion oder zur Selbstheilung kommt, ist abhängig von der Abwehrlage des Wirtes und der Wirksamkeit seiner Reaktionen auf die Sarcoptes-Milben. Diese Reaktionen werden von Signalen der geschädigten Haut und dem aktivierten Immunsystems gesteuert (Neste, 1978). Sie haben zum Ziel, den Milben die Nahrungsquelle zu entziehen und ihre Bohrtätigkeit und Vermehrung zu verhindern. Der Wirtsorganismus versucht dies durch vermehrte Bildung von Hornepithelien (Hyper- und Parakeratose), worauf die Milben mit vermehrter keratolytischer Speichelsekretion antworten. Konstantinov und Stanoeva (1976) sehen diese milbenbedingten Hautveränderungen als Ursprung eines Circulus vitiosus, da sie optimale Bedingungen für eine Milbenvermehrung darstellen. Die Retention der dicht gepackten parakeratotischen Zellen ermöglicht die Entwicklung zahlreicher Eier, die bei normaler Verhornung noch vor der Larvenreifung mitabgeschilfert würden. Gelingt es dem Wirt nicht, sich auf diese Weise von den Parasiten zu befreien, beginnt die zweite Phase der Pathogenese. Diese ist von allergischen Reaktionen – einer Sofortreaktion unter Beteiligung von Antikörpern, sowie einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ - geprägt (Gothe, 1985). Durch massenhafte Erregervermehrung wird die Sarcoptes-Räude chronisch und die beschriebenen hyper- und parakeratotischen Erscheinungen generalisieren (Martineau et al., 1987).

Eitrige Entzündungen können durch Sekundärinfektionen mit Staphylokokken und/oder Streptokokken entstehen. Kommt es durch diese Superinfektion zur Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen, können akute Glomerulonephritiden und dermale Vaskulitiden auftreten (Kraiß und Kraft, 1987).

Durch Hautblutungen kombiniert mit exogenem Eisenverlust entwickelt sich eine Anämie, die wahrscheinlich primär als Eisenmangelanämie zu erklären ist. Zu den Hautblutungen kommt es durch ständige Desquamation der Hauteithelien, Hautabschürfung und –abblätterung. Der exogene Eisenverlust ist bedingt durch verminderte Futter- und Wasseraufnahme wegen der schmerzhaften räudebedingten Rhagaden im Mundbereich und durch eine allgemeine Anorexie aufgrund des starken Juckreizes.

Wenn mehrere Hunde in einem Haushalt leben, ist davon auszugehen, dass alle milbeninfiziert sind, auch wenn nicht jedes Tier die entsprechenden Symptome aufweist. Auch andere im gleichen Haushalt lebende Tiere und Menschen können

sich infizieren. Sarcoptes-Milben wechseln von einem Wirt auf einen Träger anderer Art nur dann, wenn sie die für sie geeigneten Lebensbedingungen vorfinden. Sind diese günstig, so können sie je nach Veranlagung und Befallsintensität auch beim Menschen eine Scheinräude (Pseudoskabies) auslösen.



Abb. 4: Skabies beim Menschen. Sekundärinfizierte Herde im Bereich der Handinnenfläche
(Pschyrembel Klinisches Wörterbuch)

Es kommt zu juckendem, papulären Hautausschlag an den Unterarmen und den Händen, an der Brust oder am Bauch. Jedoch sind die wirtsfremden Sarcoptes-Milben nicht in der Lage, sich am nicht adäquaten Wirt dauerhaft anzusiedeln (Kutzer, 1966). Sie überleben dort in der Regel 14 Tage, seltener bis 24 Tage. Solche Scheinräden werden vielfach durch sekundäre bakterielle Infektionen oder allergische Reaktionen verschlimmert und täuschen dadurch eine echte Räude vor, bzw. bewirken, dass die Hautveränderungen nach dem Absterben der Milben erst nach 3-4 Wochen abheilen (Kutzer und Grünberg, 1969).

Wird die Infektionsquelle nicht beseitigt, kommt es ständig zu einem Überwechseln der Sarcoptes-Milben vom Wirtstier auf den nichtadäquaten Wirt Mensch. Dadurch wird ebenfalls eine dauerhafte Ansiedlung der Räudeerreger vorgetäuscht.

Fain (1990) spricht neben den sich erfahrungsgemäß selbst limitierenden Sarcoptes-Infestationen auch von mitunter für eine längere Zeitdauer persistierenden Befallserscheinungen.

2.4 Immunologie der Sarcoptes-Räude

Parasiten schädigen den Wirtsorganismus nicht nur aufgrund ihrer Lebensweise, sondern auch durch das Hervorrufen allergischer Reaktionen gegen ihre antigen wirkenden Sekrete und Exkrete (Moriello, 1991).

Untersuchungen ergaben, dass besonders die Ag der Sarcoptes-Milben, die sich im Speichel und im fäkalen Material befinden, für die Immunreaktionen des Wirtsorganismus verantwortlich sind. Bestätigt wurde dies durch histologische Untersuchungen, bei denen speziell im Bereich des Kopfes und der Analöffnung der Milben zelluläre Infiltrate in großer Zahl gefunden werden konnten (Arlian et al., 1994a).

Die Gewebsflüssigkeit, die in die Grabgänge der Milben sickert, stellt das Medium dar, durch das die löslichen Anteile der Milben-Ag verbreitet werden. Diese Ag provozieren eine Immunantwort des Wirtes, indem sie auf humoraler und zellulärer Ebene eine immunologische Reaktionskette induzieren.

Bei Erstkontakt der Wirtstiere mit dem Milben-Ag laufen die folgenden pathologischen und immunologischen Vorgänge ab: Nachdem die Ag von den Langerhans-Zellen der Epidermis inkorporiert und in den regionären Lymphknoten inaktiven T-Lymphozyten präsentiert wurden, ist die Immunantwort aktiviert.

Äußerlich sind in dieser Initialphase der Räude lediglich papuläre Effloreszenzen erkennbar. Da sich die Milben zunächst reaktionsarm vermehren, weisen die Hunde noch nicht den typischen Juckreiz auf, was insgesamt eine klinische Diagnose zu diesem Zeitpunkt unmöglich macht. Der Pruritus und die typischen Hautveränderungen bei Skabies-Patienten erscheinen erst bis zu 8 Wochen p. inf. (Düvier, 1990).

Immunologisch kommt es in der nächsten Phase unter dem Einfluss von Interleukin 1 und den nun gebildeten T-Zellklonen neben einer unspezifischen auch zur spezifischen zellulären Immunantwort durch differenzierte T-Zellen. Sie stellt sich histologisch durch Infiltrate in der Nähe der Hautläsionen dar, wobei die Dichte dieser Infiltrate je nach Läsion und Infektionsgrad variiert. Nach Arlian (1989) sprechen diese Zellansammlungen für das Vorliegen einer zellvermittelten Allergie vom verzögerten Typ (Typ IV-Reaktion).

Unter dem Einfluss der T-Helferzellen und Interleukin 1 differenzieren sich die B-Zellen zu Ak-bildenden Plasmazellen und setzen somit Ak im Rahmen der spezifischen humoralen Immunantwort frei. Mit Hilfe der zweidimensionalen Kreuzimmunelektrophorese (CIE) wiesen Arlian et al. (1988e) bei experimentell infizierten Kaninchen Ak gegen 9 spezifische *Sarcoptes scabiei* var. *canis*-Ag nach. Zeichen für eine humorale Immunreaktion der Wirte sind die erhöhten IgG- und IgM-Serumspiegel und der verringerte IgA-Spiegel (Neste und Salmon, 1978). Ist eine erfolgreiche Behandlung durchgeführt worden, so normalisieren sich diese Werte nach etwa 6-9 Monaten (Falk, 1980; Arlian et al., 1988e). Außerdem lassen sich neben Immunglobulin-Ablagerungen auch Komplement C₃-Ablagerungen in Haut und Hautgefäßen bei Räudepatienten finden (Soulsby, 1987; Salo et al., 1982).

Je nachdem, wie stark der Wirtsorganismus der Grab- und Reproduktionsfähigkeit der Milben entgegenwirkt, kommt es entweder zur Selbstheilung oder zur klinisch manifesten Infektion (Gothe, 1985). Die uneingeschränkte Funktionsfähigkeit des Immunsystems spielt hierbei die größte Rolle.

Ist die zelluläre und humorale Abwehrlage geschwächt, z.B. iatrogen durch lokal oder systemisch wirkende Immunsuppressiva (Paterson et al., 1985; Wolf und Krakowski, 1987), kann die Räude generalisieren. Bei chronisch-manifest erkrankten Tieren findet die Milbenvermehrung nahezu ungehemmt statt und geht mit hochgradigen para- und hyperkeratotischen Hautveränderungen einher. Man spricht in solchen Fällen vom krustösen Typ der *Sarcoptes*-Räude.

Chronisch-manifest kann die Räude auch bei primär gestörter Immunabwehr und permanentem Allergenreiz werden. In diesen Fällen kann es zu einer Immuntoleranz bis hin zur kompletten Desensibilisierung kommen, woraus eine Anergie und lang persistierende Räude resultiert (Kraiß und Kraft, 1987). Diese antigen-spezifische Reaktionsunfähigkeit kann aber auch sekundär durch Behandlung mit

Immunsuppressiva hervorgerufen sein, bei der es zur Hemmung oder Vernichtung immunkompetenter Zellen kommt (Schliesser, 1990). Jedoch lässt sich daraus nicht schlussfolgern, dass alle an einer chronischen Skabies erkrankten Wirte zu einer immunologischen Reaktion gegen das Milbenantigen unfähig sind (Dahl, 1983).

Bei einer Reinfektion mit *Sarcoptes*-Milben wird die Reaktionsfähigkeit des Wirtsorganismus von der erworbenen Abwehrfähigkeit in Form der zellvermittelten und humoralen Immunantwort individuell gesteuert.

Wie bei vielen anderen parasitären Erkrankungen kommt es bei der Räude häufig zu Überempfindlichkeitsreaktionen. Der Wirtsorganismus wird durch die Allergene der *Sarcoptes*-Milben sensibilisiert, was bei einer Reinfektion zu allergischen Reaktionen vom Typ I (Antikörper-vermittelte Reaktion vom anaphylaktischen Typ) führt. Die Hautveränderungen und der Juckreiz treten dann schon nach wenigen Tagen p. inf. auf, unabhängig von der Zahl der Milben, abhängig von der Sensibilisierungsdauer und Intensität der Primärinfektion (Barthelmes und Barthelmes, 1974).

Nur selten zeigen Tiere bei Reinfektionen sich in Dauer und Stärke gleichende Symptome auf. Die Ausbildung einer schützenden Immunität (Resistenz) ist sowohl bei Hunden (Arlan et al., 1996a), als auch bei mit *Sarcoptes scabiei* var. *canis*-infizierten Kaninchen (Arlain et al., 1994a) nachgewiesen worden. So zeigten bei einer Untersuchung an 36 Kaninchen, die insgesamt drei mal mit *Sarcoptes*-Milben infiziert wurden, 10% der Tiere eine natürliche Immunität. Diese entwickelten bereits bei der ersten Infektion nur leichte Symptome. 65% der Kaninchen bildeten nach einer zunächst schweren ersten Infektion eine erworbene Immunität aus, die durch eine stärkere zellvermittelte und eine schwächere humorale Immunantwort im Vergleich zu nicht immunen, empfänglichen Tieren charakterisiert war. Der genaue Resistenzmechanismus ist jedoch nicht bekannt.

Der erhöhte Antikörpertiter und Komplement C_3 -Spiegel sowie die Zusammensetzung der zellulären Infiltrate in der Haut treten bei allen Tieren sowohl bei der Erst- als auch bei der Reinfektion auf. Unterschiede bestehen aber in der Schnelligkeit der Infiltration und in der Dichte der verschiedenen Zellen, sowie dem Verlauf des C_3 - Spiegels während der andauernden Infektion. Zudem liegen die Ak-Titer der nichtimmunen Wirte höher.

Aus der Diskrepanz zwischen Ak-Spiegel und sich ausbildender Immunität schließen die Autoren, dass die Milbenantigene zwar eine humorale Antwort hervorrufen, diese

den Wirt aber nicht zu schützen scheint, was darauf zurückzuführen ist, dass sich die *Sarcoptes*-Milben nicht von Blut ernähren.

Bei immunen Wirten ist das zellvermittelte Abwehrsystem stärker aktiviert, während bei nicht resistenten Individuen das humorale System stärker im Vordergrund steht. Damit fällt allein der hohen Zellzahl die Bedeutung für eine schützende Immunität zu.

Impfungen mit spezifischem Milbengewebe, das die relevanten Ag enthält oder mit rekombinant hergestellten Ag könnten so den Wirt vor einer natürlichen Infektion schützen. Die *Sarcoptes*-Räude könnte somit kontrolliert und eine Übertragung auf empfängliche Wirtstiere reduziert werden.

Extrakte aus den Hausstaubmilben *Dermatophagoides farinae* (DF) und *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP) und *Sarcoptes*-Milben beinhalten viele kreuzreagierende Antigene. Mit der zweidimensionalen Kreuzimmunelektrophorese (CIE) wurde in den Seren von mit *Sarcoptes scabiei*-infizierten Kaninchen Antikörper nachgewiesen, die an 6 Antigene aus dem Körperextrakt von DP bzw. 3 Antigene aus dem Kot von DF binden (Arlan et al., 1988d).

Untersuchungen, bei denen Kaninchen zunächst mit einem gemischten Hausstaubmilben-Extrakt (50:50 DF/DP) immunisiert und anschließend mit *Sarcoptes scabiei* var. *canis* infiziert wurden, zeigten, dass 71% der immunisierten Wirte eine schützende Immunität gegen die *Sarcoptes*-Infektion ausbildeten (Arlan et al., 1995a).

Folglich müsste es möglich sein, Hausstaubmilben-Extrakte zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die *Sarcoptes*-Räude zu verwenden (Arlan et al., 1991).

2.5 Diagnose und Differentialdiagnose

Die Probleme der Diagnostik der *Sarcoptes*-Räude wurden bereits in der Einleitung angesprochen. Die Möglichkeit einer sicheren und einfachen Diagnose ist nicht allein wegen des zoonotischen Potentials der *Sarcoptes*-Räude notwendig. Durch die Schwierigkeiten ihrer klinischen Erkennung ist sie zu einem ernstem Problem geworden (Bornstein, 1995). Die Schwierigkeit liegt in der Abgrenzung zu anderen Hautaffektionen und -effloreszenzen einschließlich Pyodermien, Dermatomykosen, oberflächlichen Aberationen, Gesichtsaknen, allergischen Kontaktdermatitiden,

lokalisierten seborrhoischen Hautentzündungen, Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I, allergischer Flohdermatitis, Lebensmittelallergie sowie anderen Milbeninfestationen (Moriello, 1987; Kraiß und Kraft, 1987; Anderson, 1979).

2.4.1 Konventionelle Diagnostik:

Der direkte Nachweis der *Sarcoptes*-Milben wurde lange Zeit als Bestätigung des Räude-Verdacht in der Praxis angewendet. Er kann anhand des klinischen Bildes in Verbindung mit dem mikroskopischen Milbennachweis erbracht werden.

Günstige Entnahmestellen für die Hautgeschabsel sind die Randbezirke der veränderten Areale. An diesen Stellen wird etwas Öl aufgetragen und die Epidermis mittels Skalpell oder scharfem Löffel großflächig bis zum Austritt von Kapillarblut abgetragen (Moriello, 1987; Anderson, 1979). So werden auch Milben erreicht, die sich in den Grabgängen befinden.

Beim *Lebendnachweis* wird das Geschabsel in eine Schale gegeben und 12-24 h bei RT stengelassen. Die Milben wandern auf den Boden des Gefäßes aus und sind mit der Lupe als sich bewegende Punkte zu erkennen (Anderson, 1979).

Für den *Totnachweis* wird 5-10%ige Kali- oder Natronlauge zur Aufhellung auf das entnommene Material gegeben und anschließend mit dem Mikroskop untersucht.

Bei der *Flotationsmethode* wird dem Geschabsel erst 10%ige Kalilauge und nach kurzer Erhitzung gesättigte Zuckerlösung zugegeben. Nach Zentrifugation erfolgt die mikroskopische Untersuchung einiger Tropfen der Lösungsoberfläche.

Bei der konventionellen Nachweismethode reicht das Auffinden einer Milbe oder eines Eies zur Diagnosestellung aus. Jedoch führen auch sorgfältige Entnahmen an mehreren Stellen und gründliche Durchmusterung unter dem Mikroskop oft nicht zum Erfolg. Bei einem Teil der befallenen Tiere gelingt der Milbennachweis an untypischen Hautarealen, wogegen bei diesen in Proben klinisch veränderter Bezirke keine Milben zu finden sind. So kann auch bei negativem Befund ein Befall nicht ausgeschlossen werden (Birkenfeld, 1986). Wegen des zoonotischen Potentials der *Sarcoptes*-Räude und ihrer Neigung zum latenten Parasitenträgertum, kann eine Therapie auf Verdacht gerechtfertigt sein, wenn weder Milben noch Eier gefunden werden. Anamnese und Symptomatik müssen dabei sehr sorgfältig beachtet werden.

Die Linderung des Juckreizes bestätigt die Verdachtsdiagnose (Moriello, 1987) und ist somit diagnostisch beweisend (Muller et al., 1993).

2.4.2 Intrakutantest:

Auf dem Gebiet der Diagnostik der *Sarcoptes*-Räude spielt der Intrakutantest (IKT) noch keine Rolle, könnte aber in Zukunft eine weitere mögliche Nachweismethode darstellen. Der Schwerpunkt der IKT-Forschung liegt momentan im Bereich der Flohallergiedermatitis bei Hund und Katze. Die Tatsache, dass die Haut bei Aufnahme bzw. Applikation von verschiedenen spezifischen Allergen-/Ag-Extrakten sensibel reagiert, ist für die Differentialdiagnostik von urtikariellen Dermatitiden im IKT von großer Bedeutung.

Beck und Hiepe (1998) erprobten einen KT zur Diagnose der *Sarcoptes*-Räude an 45 räudeverdächtigen Hunden im Alter zwischen 8 Monaten und 15 Jahren. Die Ergebnisse des mittels Allergenextrakt durchgeführten IKT wurden mit den bereits bestehenden Nachweismethoden Hautgeschabsel und Serodiagnostik verglichen.

Die Durchführung erfolgte bei den Hunden mit 0,1 ml eines Milbenextraktes aus *Sarcoptes scabiei* var. *suis* (Proteingehalt 290 µg/ml), der streng intrakutan injiziert wurde. Als Milben-Spendertier diente eine mit *Sarcoptes*-Milben spontan infizierte Zuchtsau mit generalisierter Symptomatik im chronischen Stadium. 20 min post applikationem wurden Grad und Ausmaß der Hautveränderungen beurteilt und mit der Negativkontrolle (einer intrakutan injizierten Pufferlösung) verglichen.

Bei 14 Hunden (31,11%) zeigten sich allergische Hautveränderungen in Form einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I (Sofortreaktion). Demgegenüber zeigten sich bei der Nachweismethode mittels Hautgeschabsel 4 positive Befunde (8,89%) und bei der Serodiagnostik 13 positive Befunde (30,77%).

Trotz verschiedener Interpretationsschwierigkeiten scheint ein IKT zur Bestätigung des Verdachtes auf eine *Sarcoptes*-Infektion bei Hunden mit Räudesymptomatik nützlich zu sein. Dies kann daraus geschlossen werden, dass alle serologisch positiven Hunde in diesem durchgeführten IKT ebenfalls positiv reagierten. Da die *Sarcoptes*-Milben mikroskopisch nur schwer nachweisbar sind, wäre der Hauttest

eine probate Alternative für den Praktiker, durch indirekten Erregernachweis den Verdacht zumindest zu erhärten.

Als Hauptproblem bei der Einführung eines sicheren IKT zur Räudediagnostik wird von den Autoren die Gewinnung standardisierter Allergen-/Ag-Extrakte angesehen.

2.4.3 Serodiagnostik:

Der Nachweis spezifischer Antikörper im Serum sarcoptesinfizierter Hunde erfolgt mittels indirektem ELISA und hat stark an Bedeutung zugenommen.

1994 haben Arlian et al. im Serum von mit *Sarcoptes scabiei* var. *canis* infizierten Kaninchen spezifische Ak mit dem indirekten ELISA nachgewiesen. Als Ag verwenden sie einen aus getrockneten *Sarcoptes scabiei* var. *canis* hergestellten Extrakt.

Auch Bornstein und Zakrisson (1993) untersuchten Seren von experimentell mit *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* infizierten Hunden in Bezug auf die Ak-Bildung gegen *Sarcoptes scabiei* mit dem indirekten ELISA. Die für die Infektion der Hunde verwendeten Milben stammten von natürlich infizierten Rotfüchsen (*Vulpes vulpes*). Die Hunde, die mit den höchsten Ak-Spiegeln auf die Infektion antworteten, zeigten auch deutliche klinische Symptome der *Sarcoptes*-Räude, während die Hunde mit leichten klinischen Symptomen nur einen geringen Anstieg der Extinktionswerte im ELISA aufwiesen.

Das Serum räudeverdächtiger Hunde wird im indirekten ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern der IgG-Klasse gegen *Sarcoptes scabiei* var. *canis* untersucht. Die mit Milbenantigen beschichteten Mikrotiterplatten werden gewaschen und die freien Bindungsstellen mit Tween-20 blockiert. Nachdem das Hundeserum 1:160 verdünnt wurde, werden die Mikrotiterplatten damit beschichtet. Der Ak-Inkubation folgen der Auftrag von Peroxidase-konjugiertem Anti-Hund-IgG und anschließend die Substratinkubation. Die Enzymaktivität wird nach etwa 15 min in Abhängigkeit von der Reaktion der Positivkontrolle mit dem Photometer bei 405 nm gemessen (Sobek, 1998). Jedes zu untersuchende Serum wird im doppelten und das Positivkontrollserum im vierfachen Ansatz getestet. Aus den Ergebnissen erfolgt die Berechnung des Mittelwertes als absoluter Extinktionswert (E_a) der Probe.

Studien haben eine hohe Spezifität des ELISAs erwiesen, d.h., es bestehen keine Kreuzreaktionen mit Demodex-Milben, Cheyletiellen und Futtermilben. Außerdem besteht eine hohe Sensitivität, so dass ein Nachweis bereits bei Auftreten der ersten klinischen Symptome möglich ist (VetMedLab, 1998).

2.6 Therapie

Um die Parasiten systematisch zu beseitigen, muss die Behandlung eine Einheit aus Prophylaxe und Therapie darstellen (Hiepe, 1972).

Zur Beseitigung prädisponierender Faktoren ist auf ein ausgewogenes Nährstoff- und Vitaminangebot zu achten.

Die Behandlung der Sarcoptes-Räude kann auf endogenem (per injectionem) und/oder exogenem Wege (spot-on oder Waschung) erfolgen. In der Regel ist eine ausschließliche Akarizidtherapie ausreichend (Kraiß und Kraft, 1987), jedoch kann ein dauerhafter Therapieerfolg nur erzielt werden, wenn sämtliche Tiere und Lagerstätten in die Bekämpfungsmaßnahmen mit einbezogen werden.

Das erst kürzlich auf dem Markt erschienene Breitspektrum-Endektozid Selamectin (Stronghold®) zeichnet sich durch seine einfache Anwendung (spot-on Verfahren) und gute Wirkung gegen Sarcoptes-Milben aus. Zusätzlich wirkt es bei Hunden gegen Flöhe und Rundwürmer und beugt Herzwurmerkrankungen vor. Zur vollständigen Eliminierung der Sarcoptes-Milben sollte jeweils eine Dosis des Mittels (6mg/kg KGW) an zwei aufeinanderfolgenden Monaten durch Auftrag auf die Haut am Halsansatz verabreicht werden.

Zieht man die Durchführung einer Waschbehandlung vor, so sollten die Hunde vor Behandlungsbeginn in einer milden keratolytischen und antiseborrhoischen Lösung gebadet werden, um die Verkrustungen zu lösen. Anschließend erfolgt die Wasch- und Badebehandlung aller betroffenen Tiere mit geeigneten Produkten wie dem organischen Phosphorsäureester Phoxim (Sebacil®, Bayer) in einer 0,05 – 0,1%igen oder dem Amidin Amitraz (Ektodex®, Hoechst) in einer 0,025%igen Lösung. Diese Produkte sind nicht zur Therapie beim Hund zugelassen, werden aber gut vertragen und erfüllen die Anforderung an eine ausreichende Residualwirkung. Nach der

Akarizidbehandlung sind die Hunde waschfeucht zu belassen und zur Trocknung in einen zugfreien und auf mindestens 24° C temperierten Raum zu bringen.

Die Waschbehandlungen sind mindestens zweimal im Abstand von etwa 7 Tagen zu wiederholen, da sie keine ovozide Wirkung besitzen (Kraiß und Kraft, 1987).

Waschbare Gegenstände der Lagerstätten wie Decken und Kissen, sollten bei 60° C gewaschen werden. Körbchen und Hundehütten werden mit Akariziden wie Carbamaten oder Phosphorsäureester in Form von Pudern oder Sprays gründlich behandelt. Die einfachste und wirkungsvollste Dekontamination wird jedoch erreicht, wenn Lagerstätten und Zubehör der Hunde für mindestens 4 Wochen völlig unbenutzt und unberührt bleiben, da Milben außerhalb ihrer Wirte maximal nur 21 Tage überleben (Arlan et al., 1984b).

Zur endogenen Behandlung der Sarcoptes-Räude beim Hund werden vermehrt Avermectine, z.B. Ivermectin oder Doramectin eingesetzt, die sowohl gegen Endo- als auch gegen Ektoparasiten wirksam sind. Die Anwendung ist bei Collies, Shelties, Bobtails und deren Mischlingen wegen starker neurotoxischer Wirkung kontraindiziert. Bei diesen Rassen können bereits in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KGW schwere Nebenwirkungen wie Salivation, Erbrechen, Ataxie, Krämpfe, Seitenlage und komatöse Zustände bis hin zum Tod auftreten. Die Anwendung der Avermectine hat sich jedoch in der Praxis wegen unkomplizierter Handhabung und guter Wirksamkeit stark durchgesetzt und wird wahrscheinlich erst in naher Zukunft durch das neuentwickelte Stronghold® verdrängt werden.

Die Tiere, bei denen es durch bakterielle Sekundärinfektion zu schweren sekundären Pyodermien gekommen ist, sollten zusätzlich Antibiotika erhalten. Dabei sind immunsuppressive Antibiotika unbedingt zu vermeiden. Geeignet sind z.B. Chloramphenicol, Erythromycin, Lincomycin, Cephalexin und Gentamycin. Die Anwendung von Kortikosteroiden zur Linderung des Juckreizes ist von Fall zu Fall abzuwägen. Zur Therapie der Sarcoptes-Räude sind sie eigentlich kontraindiziert, doch kann eine kurzzeitige orale Kortikoidtherapie mit Prednison oder Prednisolon in einer Dosis von 0,5 mg/kg KGW über 3-4 Tage bei gesicherter Diagnose zur Besserung des Allgemeinbefindens und Linderung des Juckreizes entscheidend beitragen (Moriello, 1987; Medleau, 1990). Besser eignet sich jedoch der Einsatz von Antihistaminika, die einen ausreichend juckreizlindernden Effekt haben.

Bei Hunden mit ausgeprägter aplastischer Anämie sind Eisenpräparate einzusetzen.

Tab. 2: Behandlung der Sarcoptes-Räude beim Hund (Schein, 2000)

Medikament	Wirkstoff	Applikation	Dosierung	Anzahl der Behandlungen	Intervall
Stronghold®	Selamectin	Spot-on	6 mg/kg KG	2	30 Tage
Ectodex®**	Amitraz	Waschung	0,025 -0,05%	2 – 3	10 – 14 Tage
Sebacil®*	Phoxim	Waschung	0,1 - 0,2%	3	7 Tage
Avermectine*** Dectomax® Ivomec®	(Doramectin) Ivermectin)	s.c.-Injection	0,4 mg/kg KG	3 - 4	5 – 7 Tage

* Für den Hund nicht zugelassen

** Für den Hund nur zur Behandlung der Demodicose zugelassen

*** Für den Hund nicht zugelassen

2.7 Antigengewinnung aus Sarcoptes-Milben

Grundvoraussetzung dieser Arbeit war es, ausreichend Ag für die Laborarbeiten zur Verfügung zu haben. Es mussten also Spendertiere gefunden werden, bei denen sich eine klinisch manifeste Räude ausgebildet hatte. Nur so können die Milben in größtmöglicher Zahl unter vertretbarem Arbeits- und Zeitaufwand isoliert werden. Da die Sarcoptes-Milben von metabolisch aktiven Epidermiszellen abhängig sind, ist bisher noch keine in vitro-Vermehrung bekannt. Eine in vivo-Milbengewinnung von experimentell infizierten Tieren ist zwar möglich, jedoch ist die quantitative Ausbeute nur gering und aus tierschützerischen Gründen nicht vertretbar.

Da Kreuzreaktionen sowohl zwischen Sarcoptes-Milben und den Hausstaubmilben (DF und DP), zwischen unterschiedlichen Dermatophagoides-Arten als auch

zwischen den unterschiedlichen *Sarcoptes scabiei*-Varietäten auftreten (Arlian et al., 1991), könnten diese als alternative Ag-Quellen durchaus von Interesse sein.

Bei der Isolierung der Milben muss darauf geachtet werden, dass Kontaminationen jeglicher Art vermieden werden. Fremdpartikel oder Bakterien können neben anderen Verunreinigungen zu nicht eindeutigen oder falschen Ergebnissen führen.

Neben der Menge des verfügbaren Ags ist der Proteingehalt von entscheidender Bedeutung, da sowohl SDS-PAGE, Blot, 2-D-Elektrophorese sowie die Sequenzierung nur bei ausreichendem Proteingehalt verwertbare Ergebnisse liefern können. Alle Arbeitsschritte von der Zerkleinerung bis zur Extraktion müssen ausschließlich auf Eis erfolgen. Insbesondere ist bei der Verwendung des Ultraschalls eine Überhitzung der Suspension zu vermeiden. Der Freisetzung intrazellulärer Proteasen ist unbedingt durch Zusatz von Proteaseninhibitoren entgegenzuwirken.

2.7.1 Herstellung eines Milben-Ganzkörperextraktes

In der Literatur findet man zahlreiche Methoden zur Gewinnung von *Sarcoptes*-Milben aus Hautgeschabseln und der Herstellung eines Rohantigen-Extraktes.

Sheahan (1975a) erwärmt und schüttelt die Geschabsel in Petrischalen über 6-24 h und sammelt die Milben mittels Nadel ein. Diese werden anschließend mit dem Mörser in physiologischer Kochsalzlösung zerkleinert, zentrifugiert (bei 2000g) und der Überstand steril filtriert. Der Autor bestimmt den Proteingehalt nach der Methode von Lowry et al. (1951).

Nach Wooten und Gaafar (1984) werden mehrere Geschabsel nach der Entnahme zerkleinert, für 30 min auf einen auf 35°C temperierten Petrischalendeckel verbracht und anschließend 15 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Mittels Vakuumpumpe werden die in dieser Zeit ausgewanderten Milben abgesaugt, in 25 ml PBS (pH 7,2) gewaschen und im Inkubator bei 37°C getrocknet. Anschließend erfolgt die Suspendierung in 0,5 ml Merthiolat-NaCl-Puffer.

Arlian et al. (1988a) stellen die Schalen mit den Geschabseln um den Rand eines durch eine Lampe ausgeleuchteten Bereiches. Im Abstand von 1-3 h werden die sich im Lichtstrahl massenhaft ansammelnden Milben mittels Vakuumpumpe entnommen, unter Vakuum getrocknet und durch Einfrieren getötet. Der Milbenextrakt wird nach

Entfetten der Milben mit Diäthyläther und deren Zerkleinerung im Mörser mit 20 mM Triton-X 100 durch anschließende Zentrifugation und sterile Filtration des Überstandes (Porengröße 0,2 µm) gewonnen.

Bornstein und Zakrisson (1993) kürzen das Fell der entnommenen Hautstücke auf eine Länge von 10 mm, legen sie in Petrischalen und stellen diese für 2-4 h bei RT unter elektrisches Licht (25 W). Die ausgewanderten Milben werden durch Einfrieren bei -20°C getötet. Anschließend werden sie wieder aufgetaut und mit einem Glashomogenisator unter Zugabe eines Phosphatpuffers (PBS mit pH 7,4) bei 4°C zerkleinert. Mittels Ultraschall erfolgt die weitere Zerkleinerung. Nach dem Zentrifugieren (bei 3800g für 30 min) wird der Überstand steril gefiltert (Porengröße des Filters: 0,2 µm) und erneut bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Bradford-Methode.

Nöckler (1992) lässt die Geschabsel 2 Tage in einer feuchten Kammer bei 37°C stehen und suspendiert die eingesammelten Milben in Phosphatpuffer (0,05 M PBS, 0,005M NaN₃; pH 7,4) mittels Teflon-Homogenisator. Den Proteingehalt bestimmt er nach der Methode von Pesce und Michael (1988).

2.7.2 Untersuchung auf qualitative Eigenschaften

2.7.2.1 Proteinfractionierung in der SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen, indem die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte separiert werden.

Dies wird durch die Behandlung mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zusammen mit Schwefelbrücken-spaltenden Thiolreagenzien, wie z.B. β-Mercaptoethanol möglich. Dabei werden die Proteine vollkommen entfaltet (denaturiert) und gegebenenfalls in ihre Untereinheiten zerlegt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kommt es zu einer gleichmäßigen Beladung der Polypeptidketten mit dem negativ geladenen SDS, wobei die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Die meisten Proteine binden die Seife SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis (1,4g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösung).

Abhängig von der Konzentration des Acrylamids in den Gelen werden die Proteingemische in nieder- oder hochmolekulare Moleküle fraktioniert. Durch Molekulargewichtsmarker kann man die Molekülmasse der aufgetrennten und durch Farbreaktion sichtbar gemachten Proteinfractionen relativ genau bestimmen (Rehm, 1996).

2.7.2.2 Immunoblot

Beim Blotting werden die in einem Gel aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine Membran übertragen und somit für die nachfolgende Immunodetektion immobilisiert. Bei der Übertragung auf die Membran erscheinen die Proteine in derselben geometrischen Anordnung, wie sie nach Auftrennung im Gel vorliegen (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Vor der spezifischen Detektion müssen die freien Proteinbindungsstellen, die nicht an den darauffolgenden Reaktionen teilnehmen, blockiert werden. Der geblockte Blot wird anschließend mit anti-Antigen-Antikörper (1. Ak) inkubiert. Danach wäscht man ungebundenen 1. Ak weg und inkubiert den Blot mit einem markierten Ak (2. Ak), der an den anti-Ag-Ak bindet. Nach weiterem Waschen wird der Blot mit Hilfe der Markierung des 2. Ak entwickelt und damit die Position des Ags sichtbar.

Die Spezifität der Immunfärbung hängt sowohl von der Spezifität des 1. und des 2. Ak, als auch von der Verdünnung, in der die Ak eingesetzt wurden, ab. Die Inkubationszeiten der Ak richten sich nach der Menge von Ag und der Affinität der Ak (Westermeier, 1990; Rehm, 1996).